

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3773148号

(P3773148)

(45) 発日 平成18年5月10日(2006.5.10)

(24) 登録日 平成18年2月24日(2006.2.24)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/7076 (2006.01)

A 6 1 K 31/7076

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/00

A 0 1 N 1/02 (2006.01)

A 0 1 N 1/02

C 0 7 H 19/167 (2006.01)

C 0 7 H 19/167

請求項の数 8 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平9-311563

(22) 出願日 平成9年10月29日(1997.10.29)

(65) 公開番号 特開平11-130792

(43) 公開日 平成11年5月18日(1999.5.18)

審査請求日 平成13年10月15日(2001.10.15)

(73) 特許権者 00004477

キッコーマン株式会社

千葉県野田市野田250番地

(74) 代理人 100125542

弁理士 鈴木 英之

(72) 発明者 片岡 茂博

千葉県野田市野田339番地 キッコーマ

ン株式会社内

(72) 発明者 関中 達雄

千葉県野田市野田339番地 キッコーマ

ン株式会社内

(72) 発明者 葛西 浩一

千葉県野田市野田339番地 キッコーマ

ン株式会社内

最終頁に続く

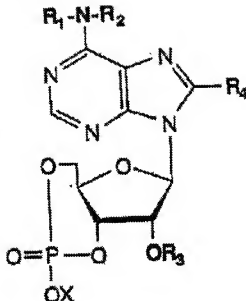
(54) 【発明の名称】 虚血性疾患予防、治療剤及び臓器保存剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記的一般式

【化1】



(式中の R_1 は、水素原子、炭素数1ないし6のアルキル基、アルキル基の炭素数が1ないし3であるアラルキル基、又はフルフリル基を、 R_2 は、水素原子、炭素数が1ないし6のアルキル基、またはアルキル基の炭素数が1ないし3であるアラルキル基を、 R_3 は、水素原子、炭素数1ないし6のアルキル基、又はアルキル基の炭素数が1ないし3であるアラルキル基を、 R_4 は、水素原子、アミノ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキルチオ基、アラルキルチオ基、又はハロゲン原子を意味し、 R_1 、 R_2 、 R_3 が共に水素原子のとき、 R_4 がハロゲン原子となることはなく、また R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 が共に同時に水素原子となることはなく、また、Xは、水素原子、アルカリ金属、アンモニウム、アミン類を意味する)で表されるアデノシン-3'、5'-環状リン酸誘導体の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする、虚血一再灌流障害の予防剤或いは治療剤。

【請求項2】

アデノシン-3'、5'-環状リン酸誘導体が N^6 -アルキル誘導体であり、式中において R_1 が、炭素数1ないし6のアルキル基、アルキル基の炭素数が1ないし3であるアラルキル基(フェニル基は、低級アルキル基、水酸基、ハロゲン原子、若しくはアミノ基を有したフェニル基であってもよい)、又はフルフリル基であり、 R_2 、 R_3 、 R_4 が共に水素原子である、請求項1記載の虚血一再灌流障害の予防剤或いは治療剤。

【請求項3】

アデノシン-3'、5'-環状リン酸誘導体が N^6 、 N^6 -ジアルキル誘導体であり、式中において R_1 、 R_2 が、共に炭素数1ないし6のアルキル基、又はアルキル基の炭素数が1ないし3であるアラルキル基(フェニル基は、低級アルキル基、水酸基、ハロゲン原子、若しくはアミノ基を有したフェニル基であってもよい)であり、 R_3 、 R_4 が共に水素原子である、請求項1記載の虚血一再灌流障害の予防剤或いは治療剤。

【請求項4】

アデノシン-3'、5'-環状リン酸誘導体が N^6 、 N^6 、2'-O-トリアルキル誘導体であり、式中において R_1 、 R_2 、 R_3 が同一で、同時に炭素数1ないし6のアルキル基、又はアルキル基の炭素数が1ないし3であるアラルキル基(フェニル基は、低級アルキル基、水酸基、ハロゲン原子、若しくはアミノ基を有したフェニル基であってもよい)であり、 R_4 が水素原子である、請求項1記載の虚血一再灌流障害の予防剤或いは治療剤。

【請求項5】

アデノシン-3'、5'-環状リン酸誘導体が N^6 、2'-O-ジアルキル誘導体であり

、式中において R_1 、 R_3 が同一で、炭素数 1 ないし 6 のアルキル基であり、 R_2 、 R_4 が共に水素原子である、請求項 1 記載の 虚血一再灌流障害の予防剤 或いは 治療剤。

【請求項 6】

アデノシン 3'、5'-環状リン酸誘導体が 8-アミノ又は 8-アルキルアミノ誘導体であり、式中において R_1 、 R_2 、 R_3 が、共に水素原子であり、 R_4 がアミノ基又は低級アルキルアミノ基である、請求項 1 記載の 虚血一再灌流障害の予防剤 或いは 治療剤。

【請求項 7】

アデノシン 3'、5'-環状リン酸誘導体が N⁶-アルキル-8-置換誘導体であり、式中において R_1 が、炭素数 1 ないし 6 のアルキル基又はベンジル基であり、 R_2 、 R_3 が共に水素原子であり、 R_4 が低級アルキルアミノ基、低級アルキルチオ基、アラシルチオ基、又はハロゲン原子である、請求項 1 記載の 虚血一再灌流障害の予防剤 或いは 治療剤。

10

【請求項 8】

請求項 1～7 記載のいずれかのアデノシン 3'、5'-環状リン酸誘導体の少なくとも一種を有効成分として含有することと特徴とする、臓器保存剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、虚血性疾患の予防又は治療剤、および臓器保存剤に関し、さらに詳しくは、特定のアデノシン 3'、5'-環状リン酸（以下、cAMP という）誘導体を有効成分とする、虚血性疾患予防、治療剤、及び臓器保存剤に関する。

20

【0002】

【従来の技術】

近年、活性酸素が生体に対して種々の影響を及ぼしていることが分かってきた。即ち、薬物、金属、虚血一再灌流、ストレスなどの引き金によって生成した活性酸素が、脂質、蛋白質、糖、DNAなどを攻撃して、様々な病態の形成や増悪を引き起こしている。最近、虚血性疾患にも活性酸素が関与していることがわかっており、その病態や疾患として虚血性脳疾患（脳梗塞、脳浮腫など）、虚血性心疾患（心筋梗塞、不整脈、狭心症など）、ショック、あるいは肺酸素中毒、臓器移植障害など多くのものがあげられる。脳梗塞の場合、血栓溶解剤を用いて血液を流れるようにすると、脳出血や脳浮腫などの虚血一再灌流障害が起こることが知られており、これを抑える良い薬は市販されていない。

30

【0003】

これらの病態に対して、D. J. Hearse らによる、アロプリノールなどのキサンチン酸化酵素阻害剤を用いる試み（Acta Physiol. Scand., Suppl. 548 巻、65 頁、1986 年参照）、S. R. Jolly らによる、スパーオキシドジスムターゼ（SOD）を用いる方法（Circ. Res., 54 巻、227 頁、1984 年参照）、ラジカルスカベンジャーを用いる方法（特開平 9-67327 号参照）、アデノシンやその関連化合物を用いる試み（特開平 4-124143 号および特許公報 2505085 号参照）がなされているが、半減期の短さ又は効果が不十分であったり、副作用の問題がある。また、臓器移植においても免疫抑制剤の登場に伴う拒絶反応の克服とともに、虚血一再灌流障害の克服が移植後の課題となっている。そして臓器を取り出ししてから移植までの時間が長いほど虚血状態が長く続くことになり、移植後の臓器障害の度合いも大きくなる。近年この観点から、臓器保存剤として、酸化還元能を有するペオキsidの使用（特開平 5-13992 号）、あるいは活性酸素抑制組成物の使用（特開平 8-26902 号参照）などが提案されている。

40

【0004】

また、N⁶、2'-O-ジブチリル cAMP などの cAMP 誘導体が脳機能改善剤として有効との提案（国際公開番号 WO 90/11080 参照）があるが、この脳機能改善剤は、脳梗塞などの虚血性疾患の直接（急性期）の予防、治療のためのものではない。つまり、前記の cAMP 誘導体は、梗塞による心臓や脳の虚血一再灌流障害からの保護では

50

なく、パーキンソン病による神経症候障害、中枢神経の変成、アルツハイマー病による痴呆症などの脳機能、神経症候障害の改善を試みるものである。また前記提案には、脳梗塞に代表される脳虚血、又は脳出血による脳障害という記述がなされているが、これは上記と同様に、脳梗塞の結果生じた後遺症である脳神経障害の治療に有効であることを示しており、そして前記の cAMP 誘導体が、前記疾患に通常使用されるイデベノンやホパテン酸カルシウム、ドパミンなどの薬剤に代わるものであるとされている。すなわち、cAMP およびその誘導体が、虚血一再灌流障害などの急性期の虚血性疾患そのものに有効という報告はない。そして、本発明に用いられる多くの化合物は、特開昭 60-239496 号、特開平 3-83995 号などに記載の公知の化合物であり、そのうちの幾つかは、強心作用を有すること（特開昭 63-208525 号参照）が知られているが、急性期の虚血疾患に対する効果を有することは知られていない。また、臓器保存剤については、N⁶, 2'-O-ジブチリル cAMP や 8-ブプロモ cAMP がその成分の一つとして有用であるとの報告（Circulation, 88 巻, Part 2, 291 頁, 1993 年参照）があるが、後述する本発明に用いられる化合物がそのような効果を有することは知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、虚血一再灌流障害により生ずる急性期の疾患、例えば虚血性脳疾患、虚血性心疾患、臓器移植障害などの予防、治療剤、および肺、肝臓、腎臓、心臓などの臓器移植のために摘出された臓器を保存するのに有効な臓器保存剤を提供することを目的としてなされたものである。

【0006】

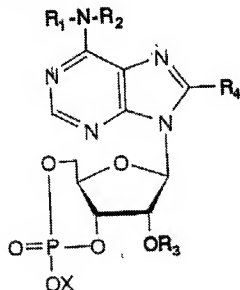
【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を達成するために鋭意研究を進めた結果、特定の cAMP 誘導体が急性期の虚血性疾患の予防、治療剤として、また臓器保護剤として有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、下記的一般式

【0007】

【化 2】



【0008】

（式中の R₁ は、水素原子、炭素数 1 ないし 6 のアルキル基、アルキル基の炭素数が 1 ないし 3 であるアラルキル基、又はフルフリル基を、R₂ は、水素原子、炭素数が 1 ないし 6 のアルキル基、またはアルキル基の炭素数が 1 ないし 3 であるアラルキル基を、R₃ は

、水素原子、炭素数1ないし6のアルキル基、又はアルキル基の炭素数が1ないし3であるアルキル基を、 R_4 は、水素原子、アミノ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、又はハロゲン原子を意味し、 R_1 、 R_2 、 R_3 が共に水素原子のとき、 R_4 がハロゲン原子となることはなく、また R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 が共に同時に水素原子となることはない。また、Xは、水素原子、アルカリ金属、アンモニア、アミン類を意味する)

で表されるアデノシン-3'，5'-環状リ核酸誘導体の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする、虚血性疾患予防、治療剤であり、また、前記のアデノシン-3'，5'-環状リ核酸誘導体の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする、臓器保存剤である。

以下、本発明について詳細に説明する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の虚血性疾患予防、治療剤および臓器保存剤に用いられる化合物は、前記一般式で表させるcAMP誘導体であって、式中の R_1 は、水素原子、炭素数1ないし6のアルキル基、アルキル基の炭素数が1ないし3であるアルキル基、又はフルフリル基を示す。

R_1 において、炭素数1ないし6のアルキル基としては直鎖状または分岐鎖状のアルキル基であり、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ヘキシル基が挙げられ、炭素数が6を超えるときは、本発明の目的を十分に達成することができない(後述の R_2 、 R_3 におけるアルキル基も同様)。また、アルキル基の炭素数が1ないし3であるアルキル基としては、例えばベンジル基、メチルベンジル基、ハイドロキシベンジル基、アミノベンジル基、クロロベンジル基、プロモベンジル基、フルオロベンジル基、フェネチル基、フェニルプロピル基などが挙げられる。アルキル基の炭素数が3を超えるとときは、本発明の目的を十分に達成することができない(後述の R_2 、 R_3 においても同様)。

【0010】

また、前記一般式中の R_2 は、水素原子、炭素数1ないし6のアルキル基、またはアルキル基の炭素数が1ないし3であるアルキル基を示す。そして、 R_2 における炭素数1ないし6のアルキル基としては、例えば前記した R_1 と同様のアルキル基が挙げられ、またアルキル基の炭素数が1ないし3であるアルキル基としては、例えば前記した R_1 と同様のアルキル基が挙げられる。

【0011】

また、前記一般式中の R_3 は、水素原子、炭素数1ないし6のアルキル基、又はアルキル基の炭素数が1ないし3であるアルキル基を示し、炭素数1ないし6のアルキル基としては、具体的には前記した R_1 、 R_2 と同様のアルキル基が、また、アルキル基の炭素数が1ないし3であるアルキル基としては、前記した R_1 、 R_2 と同様のアルキル基が挙げられる。

【0012】

また、前記一般式中の R_4 は、水素原子、アミノ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキルチオ基、アルキルチオ基、又はハロゲン原子を示す。アルキル基が低級アルキル基である前記のアルキルアミノ基としては、例えばメチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基、ジエチルアミノ基、プロピルアミノ基、ジプロピルアミノ基、ブチルアミノ基、ジブチルアミノ基などが挙げられる。また、低級アルキルチオ基としては、例えばメチルチオ基、エチルチオ基、プロピルチオ基、ブチルチオ基などが、またアルキルチオ基としては、ベンジルチオ基、ハイドロキシベンジルチオ基などが挙げられる。

そして、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 が共に同時に水素原子となることはない。

【0013】

また、一般式中のXは、水素原子、又はナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、アンモニア、又はトリエチルアミンなどのアミン類を示す。

【0014】

10

20

30

40

50

次いで、本発明に用いられる好適な c AMP 誘導体の具体例を挙げる。

先ず、一般式中において R_1 が、炭素数 1 ないし 6 のアルキル基、アルキル基の炭素数が 1 ないし 3 であるアラルキル基、又はフルフリル基であり、 R_2 、 R_3 、 R_4 が共に水素原子である c AMP 誘導体としては、例えば N^6 -エチル c AMP、 N^6 -プロピル c AMP、 N^6 -ブチル c AMP、 N^6 -イソブチル c AMP、 N^6 -ペンチル c AMP、 N^6 -ヘキシル c AMP、 N^6 -ベンジル c AMP、 N^6 -フルフリル c AMP、 N^6 -クロロベンジル c AMP、 N^6 -ハイドロキシベンジル c AMP、 N^6 -フェネチル c AMP、 N^6 -フェニルプロピル c AMP などの N^6 -アルキル c AMP が挙げられる。

【0015】

また、一般式中において、 R_1 、 R_2 が、共に炭素数 1 ないし 6 のアルキル基、又はアルキル基の炭素数が 1 ないし 3 であるアラルキル基であり、 R_3 、 R_4 が共に水素原子である c AMP 誘導体としては、例えば N^6 、 N^6 -ジメチル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジエチル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジプロピル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジブチル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジペンチル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジヘキシル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジベンジル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジメチルベンジル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジクロロベンジル c AMP、 N^6 、 N^6 -ハイドロキシベンジル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジフェネチル c AMP、 N^6 、 N^6 -ジフェニルプロピル c AMP などの N^6 、 N^6 -ジアルキル c AMP が挙げられる。

【0016】

また、一般式中において、 R_1 、 R_2 、 R_3 が同一で、同時に炭素数 1 ないし 6 のアルキル基、又はアルキル基の炭素数が 1 ないし 3 であるアラルキル基であり、 R_4 が水素原子である c AMP 誘導体としては、例えば N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリエチル c AMP、 N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリプロピル c AMP、 N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリブチル c AMP、 N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリペンチル c AMP、 N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリヘキシル c AMP、 N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリベンジル c AMP、 N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリフェネチル c AMP、 N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリフェニルプロピル c AMP などの N^6 、 N^6 、 $2'$ - O -トリアルキル c AMP が挙げられる。

【0017】

また、一般式中において、 R_1 、 R_3 が同一で、炭素数 1 ないし 6 のアルキル基であり、 R_2 、 R_4 が共に水素原子である c AMP 誘導体としては、例えば N^6 、 $2'$ - O -ジメチル c AMP、 N^6 、 $2'$ - O -ジエチル c AMP、 N^6 、 $2'$ - O -ジプロピル c AMP、 N^6 、 $2'$ - O -ジブチル c AMP、 N^6 、 $2'$ - O -ジイソブチル c AMP、 N^6 、 $2'$ - O -ジペンチル c AMP、 N^6 、 $2'$ - O -ジヘキシル c AMP などの N^6 、 $2'$ - O -ジアルキル c AMP が挙げられる。

【0018】

また、一般式中において、 R_1 、 R_2 、 R_3 が、共に水素原子であり、 R_4 がアミノ基又は低級アルキルアミノ基である c AMP 誘導体としては、例えば 8-アミノ c AMP、8-メチルアミノ c AMP、8-ジメチルアミノ c AMP、8-エチルアミノ c AMP、8-ジエチルアミノ c AMP、8-プロピルアミノ c AMP、8-ジプロピルアミノ c AMP、8-ブチルアミノ c AMP などの 8-アミノ c AMP 又は 8-アルキルアミノ c AMP が挙げられる。

【0019】

また、一般式中において、 R_1 が、炭素数 1 ないし 6 のアルキル基又はベンジル基であり、 R_2 、 R_3 が共に水素原子であり、 R_4 が低級アルキルアミノ基、低級アルキルチオ基、アラルキルチオ基、又はハロゲン原子である c AMP 誘導体としては、例えば N^6 -ブチル-8-ベンジルチオ c AMP、 N^6 -ペンチル-8-プロモ c AMP、 N^6 -プロピル-8-ベンジルチオ c AMP、 N^6 -ヘキシル-8-クロロ c AMP、 N^6 -ブチル-8-エチルチオ c AMP、 N^6 -エチル-8-プロピルアミノ c AMP などの N^6 -アルキル-8-置換 c AMP が挙げられる。

【0020】

前記したこれら c AMP 誘導体は、虚血性浮腫に対して強い抑制作用を有するので、虚血

10

20

30

40

50

による疾患（虚血性脳疾患、虚血性心疾患、虚血一再灌流障害、臓器移植時の障害）の予防、治療剤として、あるいは臓器移植の際の虚血状態にある臓器の保存剤としても有効に用いられる。

【0021】

本発明に用いられる cAMP 誘導体（以下、本 cAMP 誘導体ということがある）の 1 種又は 2 種以上を含有させて脳梗塞、脳浮腫、心筋梗塞、不整脈、狭心症などの虚血性疾患予防、治療剤として投与する場合、内服薬あるいは注射薬として用いるのが好ましい。内服薬として用いる場合は、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤などとして、経口投与してもよいし、また直腸投与のために座剤の形で投与できる。経口投与の場合は、本 cAMP 誘導体に、薬理学的に許容される添加物、すなわち賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、保存剤などを加えることができる。また非経口投与の場合には、例えば注射剤の形で使用され、注射剤としては無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤などが含まれる。更に、必要に応じて防腐剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解補助剤等を添加しても良い。またこれを通常の無菌化処理した後、凍結乾燥などにより固相組成物として、使用直前に滅菌液体を加えて使用することもできる。

本発明の虚血性疾患予防、治療剤を投与する場合は、症状の程度、年齢、体重により異なるが、経口投与の場合、一般に成人一日当たり本 cAMP 誘導体を $0.01 \sim 400 \text{ mg} / \text{kg}$ 、好ましくは $0.5 \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ を 1 ～ 数回に分けて、また非経口投与の場合には $0.001 \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ 、好ましくは $0.01 \sim 50 \text{ mg} / \text{kg}$ を 1 ～ 数回に分けて投与するのが好ましい。

【0022】

また、本 cAMP 誘導体の 1 種または 2 種以上を有効成分として含有させて臓器移植時の臓器保存剤として使用する場合は、これを液体に溶解するか、又はその凍結乾燥などにより固相組成物とし、使用直前に滅菌液体を加えて使用する。この保存剤を保存液の形態で用いる場合には、例えば生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、クエン酸緩衝など生理的に許容される緩衝液や等張化液などに、本 cAMP 誘導体を溶解して調製することが出来る。

また好ましくは、従来より移植用臓器の保存液として用いられているユーロコリンズ（Eurocollins）液やユニバーシティ オブ ウィスコンシン（UW）液などに、本 cAMP 誘導体の必要量を添加して調製することが出来る。

臓器保存剤として使用する場合は、本 cAMP 誘導体を $0.01 \sim 100 \text{ mM}$ 好ましくは $0.1 \sim 30 \text{ mM}$ とするのがよい。

【0023】

これら cAMP 誘導体を得るには、その製造方法は特に限定されず、どのような方法でもよく、例えば N^6 -アルキル cAMP 誘導体は、特開昭 60-239496 号に記載の方法に従い、cAMP と対応するアルデヒドと還元剤を用いる還元アルキル化反応により、また、 N^6 - β -アルキル cAMP 誘導体は、特開平 3-83995 号に記載の方法に従い、 $2'$ -O-トリアルキル水溶液中で脱保護することにより得られる。また、 N^6 、 $2'$ -O-トリアルキル cAMP 誘導体は、特公 7-64868 号に記載の方法に従い、cAMP を NaH 存在下、ハロゲン化アルキルと反応させることにより、また、 N^6 、 $2'$ -O- β -アルキル cAMP は特公 7-116213 号に記載の方法に従い、cAMP をナトリウムメトキシド存在下、ハロゲン化アルキルと反応させることにより得られる。また 8-置換 cAMP 誘導体は、Muneyama の方法（Biochemistry, 10 巻、2390 頁、1971 年参照）により、さらにまた、 N^6 -アルキル-8-置換 cAMP 誘導体は、Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 36 巻、2212 頁、1988 年、に記載の方法を用いるか又は応用し、8 置換 cAMP と対応するアルデヒドと還元剤を用いる還元アルキル化反応により得ることが出来る。

【0024】

【実施例】

以下に、参考例、実験例、実施例を挙げてさらに詳細に説明するが、本発明は、これらの例によって限定されるものではない。

参考例 1 (N⁶-プロピル c AMP の製造)

c AMP のトリブチルアミン塩 5.0 g を酢酸 100 ml に溶解し、プロピオンアルデヒド 5.8 ml を添加し、50℃に加熱下で攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム 2.5 g を含んだジメチルホルムアミド 6 ml を加え、5 時間攪拌した。反応混合物に少量の水を加え、溶媒を減圧留去したのち、残査を少量の水に溶解し、塩酸で pH 2 に調整し、活性炭カラムに吸着させ、水洗後、メタノール/水/28%水酸化アンモニウム(容量比 10:10:1)で溶出する区分を減圧乾固した。残査を prep. TLC (メタノール/クロロホルム; 容量比 35:65)で精製した。得られた無色固体に水-メタノール、2N-NaOH を添加して溶解し、2N 塩酸で pH 2 に調整して目的の化合物 N⁶-プロピル c AMP 2.4 g を得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 267 (17600)

元素分析値: C₁₃H₁₈N₅O₆P · 3/4H₂O として

	C	H	N
実測値 (%)	40.64	5.00	18.09
計算値 (%)	40.58	5.11	18.20

【0025】

参考例 2 (N⁶-ブチル c AMP の製造)

c AMP のトリブチルアミン塩 5.0 g を酢酸 100 ml に溶解し、ブチルアルデヒド 8.7 ml を添加し、50℃に加熱下、攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム 2.5 g を含んだジメチルホルムアミド 6 ml を加え、6 時間攪拌した。次いで、参考例 1 に示したと同様の後処理をして、無色粉状の目的の化合物 N⁶-ブチル c AMP 2.8 g を得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 267 (17100)

元素分析値: C₁₄H₂₀N₅O₆P · 2/3H₂O として

	C	H	N
実測値 (%)	42.26	5.22	17.61
計算値 (%)	42.32	5.41	17.63

【0026】

参考例 3 (N⁶-イソブチル c AMP の製造)

c AMP のトリブチルアミン塩 5.0 g を酢酸 100 ml に溶解し、イソブチルアルデヒド 7.1 ml を添加し、50℃に加熱下で攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム 2.5 g を含んだジメチルホルムアミド 6 ml を加え、5 時間攪拌した。参考例 1 に示したと同様の後処理をして、目的の化合物 N⁶-イソブチル c AMP 1.6 g を得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 267 (17600)

元素分析値: C₁₄H₂₀N₅O₆P · 2/3H₂O として

	C	H	N
実測値 (%)	42.15	5.20	17.50
計算値 (%)	42.32	5.41	17.63

【0027】

10

20

30

40

50

参考例 4 (N⁶-ペンチル cAMP の製造)

cAMP のトリブチルアミン塩 5.0 g を酢酸 100 ml に溶解し、バレラルデヒド 10.6 ml を添加し、50℃ に加熱下で攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム 3.1 g を含んだジメチルホルムアミド 6 ml を加え、8 時間攪拌した。次いで参考例 1 に示したと同様の後処理をして、目的の化合物 N⁶-ペンチル cAMP 1.8 g を得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 267 (16700)

元素分析値: C₁₅H₂₂N₅O₆P · 3/2H₂O として

	C	H	N
実測値 (%)	42.01	5.66	16.23
計算値 (%)	42.26	5.91	16.43

10

【0028】

参考例 5 (N⁶-ヘキシル cAMP の製造)

cAMP のトリブチルアミン塩 5.0 g を酢酸 100 ml に溶解し、カプロアルデヒド 12 ml を添加し、50℃ に加熱下で攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム 2.5 g を含んだジメチルホルムアミド 6 ml を加え、6 時間攪拌した。次いで参考例 1 に示したと同様の後処理をして、N⁶-ヘキシル cAMP 2.6 g を得た (なお、後述の動物試験には、0.2N NaOH で中和して得た N⁶-ヘキシル cAMP の Na 塩を使用した)。

20

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 267 (17700)

元素分析値: C₁₆H₂₄N₅O₆P · 2/3H₂O として

	C	H	N
実測値 (%)	45.08	5.84	16.31
計算値 (%)	45.18	6.00	16.46

30

【0029】

参考例 6 (N⁶-ベンジル cAMP の製造)

cAMP のトリブチルアミン塩 5.0 g を酢酸 100 ml に溶解し、ヘプチルアルデヒド 10.2 ml を添加し、50℃ に加熱下で攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム 3.1 g を含んだジメチルホルムアミド 6 ml を加え、8 時間攪拌した。次いで参考例 1 に示したと同様の後処理をして、無色粉状の目的の化合物 N⁶-ベンジル cAMP 2.2 g を得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 268 (18600)

元素分析値: C₁₇H₂₈N₅O₆P · H₂O として

40

	C	H	N
実測値 (%)	46.50	4.66	15.84
計算値 (%)	46.72	4.58	16.03

【0030】

参考例 7 (N⁶-フルフリル cAMP の製造)

cAMP のトリブチルアミン塩 5.0 g を酢酸 100 ml に溶解し、フルフラール 8.4 ml を添加し、50℃ に加熱下で攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム 2.5 g を含んだジメチルホルムアミド 6 ml を加え、8 時間攪拌した。次いで参考例 1 に示し

50

たと同様の後処理をして、無色粉状の目的の化合物 N^6 -フルフリル c AMP 2、3 g を得た。なお、元素分析には、Na 塩を調製し、測定した。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 266 (16500)

元素分析値: $C_{15}H_{16}N_5O_7PNa \cdot 3/2H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	39.27	3.67	14.96
計算値 (%)	39.31	3.95	15.28

10

【0031】

参考例 8 (N^6 , N^6 -ジブチル c AMP の製造)

(1) 2'-オートシル c AMP の合成

c AMP (32.9 g) の水酸化ナトリウム (11 g) 水溶液 (200 ml) にトシルクロライド (86 g) のジオキサン (600 ml) 溶液を加え、室温で一晩攪拌した。生成した沈殿をろ取し、ジオキサン洗浄し、乾燥して 2'-オートシル c AMP 39 g を得た。

UV: λ_{\max} EtOH (ϵ) nm: 258 (14400)

元素分析値: $C_{17}H_{18}N_5O_6P \cdot 2/3H_2O$ として

20

	C	H	N
実測値 (%)	41.03	3.85	14.16
計算値 (%)	41.23	3.90	14.14

(2) N^6 , N^6 -ジブチル c AMP の製造

前記のごとくして得た 2'-オートシル c AMP (2.0 g) のジメチルスルホキシド (20 ml) 溶液に、水素化ナトリウム (660 mg)、ブチルブロマイド (1.8 ml) を添加し、室温下、2日間攪拌した。反応液にメタノール/水 (60 ml: 60 ml)、2N 水酸化ナトリウム (14 ml) を加え、室温で一晩攪拌した。その後、濃塩酸で中和、溶媒留去後、残渣を水に溶解し、2N 塩酸で pH 2 に調整し、活性炭カラムに吸着させ、水で洗浄し、エタノール/水/28% 水酸化アンモニウム (容量比 10:10:1) で溶出する区分を減圧乾固した。残渣を少量のメタノールに溶解し、2N 塩酸で pH 2 に調整し、prep TLC (メタノール/クロロホルム; 容量比 3:7) で精製し、目的とする N^6 , N^6 -ジブチル c AMP 1.26 g を得た。

30

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 278 (19300)

元素分析値: $C_{18}H_{28}N_5O_6P \cdot 4/3H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	47.59	6.40	15.29
計算値 (%)	47.52	6.53	15.39

40

【0032】

参考例 9 (N^6 , N^6 -ジベンチル c AMP の製造)

参考例 8 に示したと同様の方法でおこなった。すなわち、2'-オートシル c AMP (2.0 g) のジメチルスルホキシド (20 ml) 溶液に水素化ナトリウム (660 mg)、ベンチルブロマイド (2.3 ml) を添加し、室温で2日間反応させた。この反応液にメタノール/水 (30 ml: 70 ml)、2N 水酸化ナトリウム (14 ml) を加え、室温で3日攪拌した。次いで参考例 8 の (2) と同様の後処理をして目的化合物の N^6

50

、 N^6 -ジベンチル c AMP を 0.934 g 得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 279 (19800)

元素分析値: $C_{20}H_{32}N_5O_6P \cdot H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	49.63	6.82	14.35
計算値 (%)	49.73	7.05	14.50

【0033】

参考例 10 (N^6 , N^6 -ジベンチル c AMP の製造)

参考例 8 に示したと同様の方法でおこなった。すなわち、2'-オートシル c AMP (2.0 g) のジメチルスルホキサイド (20 ml) 溶液に水素化ナトリウム (730 mg)、ベンジルプロマイド (2.6 ml) を添加し、室温下で 7 時間反応させた。この反応液にメタノール/水 (30 ml: 70 ml)、2N 水酸化ナトリウム (13 ml) を加え、室温下で 2 日攪拌した。次いで参考例 8 - (2) と同様の後処理をして目的化合物の N^6 , N^6 -ジベンチル c AMP を 0.773 g 得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 277 (22100)

元素分析値: $C_{24}H_{24}N_5O_6P \cdot 3/2H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	53.53	4.82	12.71
計算値 (%)	53.73	5.07	13.05

【0034】

参考例 11 (N^6 , N^6 , 2'-オートリエチル c AMP の製造)

c AMP トリブチルアミン塩 (2.1 g) のジメチルスルホキサイド (20 ml) 溶液に水素化ナトリウム (800 mg)、エチルプロマイド (2.1 ml) を添加し、室温下で 8 時間攪拌した。反応液を 2N 塩酸で pH 2 に調整した後、溶媒を減圧留去した。残留する油状物質にベンゼン (50 ml) を加えて溶解し、水 150 ml / 回で 4 回洗浄した。ベンゼン層を分取し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、減圧乾留した。得られた残査を少量のメタノールに溶解し、prep. TLC (メタノール/クロロホルム; 容量比 1: 4) にて精製し、目的化合物の N^6 , N^6 , 2'-オートリエチル c AMP を 0.96 g 得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 277 (18700)

元素分析値: $C_{16}H_{24}N_5O_6P \cdot 1/2H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	45.48	5.86	16.51
計算値 (%)	45.50	5.96	16.58

なお、動物試験にはこの化合物を 0.2N NaOH で中和して Na 塩としたものを使用した。

【0035】

参考例 12 (N^6 , N^6 , 2'-オートリブチル c AMP の製造)

c AMP トリブチルアミン塩 (2.1 g) のジメチルスルホキサイド (20 ml) 溶液に水素化ナトリウム (800 mg)、ブチルプロマイド (2.1 ml) を添加し、室温下で 1 日間攪拌した。次いで参考例 11 と同様に後処理し、目的化合物の N^6 , N^6 , 2'-オートリブチル c AMP を 0.94 g を得た。

なお、動物試験にはこの化合物を0.2N NaOHで中和してNa塩としたものを使用した。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 277 (18400)

元素分析値: $C_{22}H_{36}N_5O_6P \cdot 2/3H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	52.21	7.19	13.42
計算値 (%)	51.86	7.38	13.74

【0036】

参考例13 (N^6 , 2'-O-ジブチルcAMPの製造)

cAMPトリブチルアミン塩(3.1g)のジメチルスルホキサイド(50ml)溶液に、28%ナトリウムメトキサイド(25.6ml)、ブチルブロマイド(10.3ml)を添加し、室温下で1日間攪拌した。この反応液を2N塩酸で中和した後、溶媒を減圧留去した。残査を少量の水に溶解し、2N塩酸でpH2に調整した後、活性炭カラムに吸着させ、水で洗浄後、エタノール/水/28%水酸化アンモニウム(容量比10:10:1)で溶出する区分を減圧乾固した。得られた残査を少量のメタノールに溶解し、2N塩酸でpH2に調整、prep. TLC(メタノール/クロロホルム; 容量比3:7)にて精製し、目的化合物である N^6 , 2'-O-ジブチルcAMPを0.54g得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 267 (16400)

元素分析値: $C_{18}H_{28}N_5O_6P \cdot H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	46.85	6.24	14.94
計算値 (%)	47.06	6.58	15.24

【0037】

参考例14 (8-ジメチルアミノcAMPの製造)

Muneyamaらの方法(バイオケミストリー、10巻、2390頁、1971年参照)で合成した。すなわち、8-ブトロモcAMP3gのメタノール(20ml)溶液に、ジメチルアミン(18ml)を添加し、一晩加熱還流した。溶媒を留去した後、残査をシリカゲルカラム(30g)に添付し、クロロホルム-メタノール(容量比3:1)で洗浄後、メタノールで溶出し、目的化合物を含む区分を減圧乾固した。得られた残査を水より再結晶して目的化合物8-ジメチルアミノcAMP2.1gを得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH nm: 273

λ_{\max} 0.1N HCl nm: 278

【0038】

参考例15 (N^6 -ブチル-8-ベンジルチオcAMPの製造)

前記したMuneyamaらの方法で合成した8-ベンジルチオcAMPのトリブチルアミン塩3.2gを酢酸100mlに溶解し、ブチルアルデヒド3.4mlを添加し、室温下で攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム1.4gを含んだジメチルホルムアミド6mlを加え、4時間攪拌した。次いで参考例1と同様の後処理をして無色粉状の目的化合物の N^6 -ブチル-8-ベンジルチオcAMP2.1gを得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 292 (16300)

元素分析値: $C_{21}H_{26}N_5O_6P \cdot H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	48.02	5.43	13.25
計算値 (%)	48.00	5.37	13.33

【0039】

参考例16 (N^6 -ベンチル-8-ブプロモcAMPの製造)

8-ブプロモcAMPのトリブチルアミン塩2.7gを酢酸100mlに溶解し、バレリアルデヒド8.5mlを添加し、室温下で攪拌した。次いでシアノ水素化ほう素ナトリウム1.8gを含んだジメチルホルムアミド6mlを加え、6時間攪拌した。参考例1と同様の後処理をして無色粉状の目的とする化合物の N^6 -ベンチル-8-ブプロモcAMP1.8gを得た。

UV: λ_{\max} 0.1N NaOH (ϵ) nm: 269 (17100)

元素分析値: $C_{15}H_{21}N_5O_6PBr \cdot 1/2H_2O$ として

	C	H	N
実測値 (%)	48.02	5.43	13.25
計算値 (%)	48.00	5.37	13.33

【0040】

実験例1 (急性毒性試験)

表1に示す各cAMP誘導体を生理食塩水に溶解し、5週齢のICR系マウス(雌5匹/群)に腹腔内投与してLD₅₀を求めた。その結果を表1に示す。

【0041】

【表1】

表1

化合物名	LD ₅₀ (mg/kg)
N^6 -ブロピルcAMP	400
N^6 -ブチルcAMP	350
N^6 -ベンジルcAMP	380
N^6 -フルフリルcAMP	480
N^6 , N^6 -ジブチルcAMP	400
N^6 -ブチル-8-ベンジルチオcAMP	350

なお、表1に示した各cAMP誘導体は、参考例1、2、6、7、8及び15に記載したと同様にして得たものである。

【0042】

実施例1 (虚血性浮腫に対する抑制試験)

7~8週齢のd dy雄性マウスを用い、表2に示す各被検物質を虚血する30分前に投与した。なお、対照には生理食塩水を投与した。

浮腫抑制試験は、マウス右後足に輪ゴム(直径4.2mm)で縛り、虚血状態とした。20分後に輪ゴムを取り除き血流を再開させたときの浮腫の程度を調べることによって行なっ

た。浮腫の程度は、再灌流20分後に、OZAKI MFG. CO., LTD社製の「dial thickness gage G MICRO G-1M」を用いて、右足の厚さ(mm)を測定することで数値化した。

被検物質は、生理食塩水に溶解し、これを10mg/kg投与量で静脈内投与した。なお、生理食塩水に溶解しにくい化合物については腹腔内投与した。浮腫抑制率(%)は、A:被検物質投与における虚血前の足の厚さ(mm)、B:被検物質投与における再灌流後20分の足の厚さ(mm)、C:対照の虚血前の足の厚さ(mm)、D:対照の再灌流後20分の足の厚さ(mm)を測定し、測定したA、B、C、Dから、 $\{1 - (B - A) \div (D - C)\} \times 100$ の計算によって求めた。

このようにして求めた各被検物質の浮腫抑制率(%)を表2に示す。

10

【0043】

表2

被検物質名		浮腫抑制率(%)
1	N ⁶ -プロピルcAMP	40
2	N ⁶ -ブチルcAMP	35
3	N ⁶ -イソブチルcAMP	50
4	N ⁶ -ペンチルcAMP	53
5	N ⁶ -ヘキシルcAMPNa	46
6	N ⁶ -ベンジルcAMP	58
7	N ⁶ -フルフリルcAMP	25
8	N ⁶ , N ⁶ -ジブチルcAMP	25
9	N ⁶ , N ⁶ -ジペンチルcAMP	30
10	N ⁶ , N ⁶ -ジベンジルcAMP	20
11	N ⁶ , N ⁶ , 2'-O-トリエチルcAMPNa	25
12	N ⁶ , N ⁶ , 2'-O-トリブチルcAMPNa	30
13	N ⁶ , 2'-O-ジブチルcAMP	36
14	8-ジメチルアミノcAMP	30
15	N ⁶ -ブチル-8-ベンジルチオcAMPNa	38
16	N ⁶ -ペンチル-8-ブロモcAMP	27
比較例1;cAMPNa		—
比較例2;N ⁶ , 2'-O-ジブチルcAMPNa		5
比較例3;8-ブロモcAMP		5
比較例4;アデノシン		—

20

30

40

表中の—は、活性なしを表す。

なお、表2中のNo. 1~16に示す各cAMP誘導体は、それぞれ前記参考例1~16に記載したと同様の方法で得たものである。

【0044】

表2に示したように、本発明に用いられるcAMP誘導体は、いずれも虚血性浮腫に対して強い抑制作用を有することが確認された。一方cAMP、8-ブロモcAMP、アシル誘導体であるN⁶, 2'-O-ジブチルcAMP、さらにはcAMP類似化合物である

50

アデノシンなどには殆ど活性がないか、あっても非常に弱いものであり、本発明に用いられる cAMP 誘導体が、虚血性浮腫に対し優れた抑制作用を有することがわかる。よって本発明化合物は、虚血による疾患（虚血性脳疾患、虚血性心疾患、虚血一再灌流障害など）の予防、治療として、そして臓器移植用の臓器が保存されている状態においては、その臓器はまさに虚血状態であるので、本 cAMP 誘導体は、臓器保存効果が知られている N⁶, 2'-ジブチル cAMP、8-ブプロモ cAMP よりも優れた効果を示し、臓器保存剤としても有用である。

【0045】

実施例 2（アンブル型の虚血性疾患予防、治療剤）

N⁶-ブチル cAMP 9 g を注射用蒸留水 300 ml に溶解し、無菌ろ過した後、アンブルに 3 ml づつ充填し、アンブル型の非経口投与用の虚血性疾患予防、治療剤を調製した。なお、使用した N⁶-ブチル cAMP は、参考例 2 に記載したと同様の方法で得たものである。

【0046】

実施例 3（アンブル型の虚血性疾患予防、治療剤）

N⁶-ベンジル cAMP 3 g を、注射用蒸留水 300 ml に溶解し、無菌ろ過した後、アンブルに 2 ml づつ充填し、アンブル型の非経口投与用の虚血性疾患予防、治療剤を調製した。なお、使用した N⁶-ベンジル cAMP は、参考例 6 に記載したと同様の方法で得たものである。

【0047】

実施例 4（カプセルタイプの虚血性疾患予防、治療剤）

組成成分；

N ⁶ -ベンチル cAMP	250 g
バレイショ澱粉	150 g
軽質無水ケイ酸	50 g
ステアリン酸マグネシウム	10 g
乳糖	540 g

上記組成成分を均一に混合し、硬質カプセルに 500 mg づつ充填して経口投与用のカプセルタイプの虚血性疾患予防、治療剤を調製した。

なお、使用した N⁶-ベンチル cAMP は、参考例 4 に記載したと同様の方法で得たものである。

【0048】

実施例 5（錠剤型の虚血性疾患予防、治療剤）

組成成分；

N ⁶ -ブチル-8-ベンジルチオ cAMP Na	400 g
バレイショ澱粉	150 g
結晶セルロース	60 g
軽質無水ケイ酸	50 g
ヒドロキシプロピルセルロース	30 g
ステアリン酸マグネシウム	15 g
乳糖	295 g

上記の N⁶-ブチル-8-ベンジルチオ cAMP Na、乳糖、バレイショ澱粉、結晶セルロースおよび軽質無水ケイ酸を混合し、ヒドロキシプロピルセルロースの 10% エタノール溶液を加えて練合、造粒して径 0.8 mm のスクリーンで押し出して顆粒を調製し、乾燥した後ステアリン酸マグネシウムを加えて圧縮成形し、500 mg の錠剤型の虚血性疾患予防、治療剤を調製した。

なお、使用した N⁶-ブチル-8-ベンジルチオ cAMP Na は、参考例 15 に記載したと同様の方法で得たものである。

【0049】

実施例 6（臓器保存剤）

10

20

30

40

50

組成成分；

デキストラン	50 g / リットル
グルコン酸カリウム	95 mmol / リットル
KH_2PO_4	25 mmol / リットル
MgSO_4	5 mmol / リットル
グルコース	65 mmol / リットル
アデノシン	5 mmol / リットル
N-アセチルシステイン	0.5 mmol / リットル
N ⁶ -ベンチル cAMP	1 mmol / リットル

上記の成分を混合して pH 7 ~ 8 に調製し、臓器保存用液を調製した。

なお、使用した N⁶-ベンチル cAMP は、参考例 6 に記載したと同様の方法で得たものである。

【0050】

実施例 7 (臓器保存剤)

組成成分；

ヒドロキシエチル澱粉	60 g / リットル
KH_2PO_4	6.5 mmol / リットル
K_2HPO_4	18 mmol / リットル
グルコン酸カリウム	86 mmol / リットル
グルコン酸ナトリウム	10 mmol / リットル
マンニトール	90 mmol / リットル
NaHCO_3	10 mmol / リットル
N ⁶ -ベンチル cAMP	2 mmol / リットル

上記の成分を混合して pH 7 ~ 8 に調製し、臓器保存用液を調製した。

なお、使用した N⁶-ベンチル cAMP は、参考例 4 に記載したと同様の方法で得たものである。

【0051】

【発明の効果】

本 cAMP 誘導体は、虚血-再灌流障害による浮腫を強く抑制する作用を有するので、これを有効成分として含有させた本発明の虚血性疾患予防、治療剤は、急性期の虚血性脳疾患、虚血性心疾患、臓器移植障害などの予防、治療剤として有効に用いられる。また、本発明の臓器保存剤は、虚血状態にある肺、肝臓、腎臓、心臓などの移植用摘出臓器を保存する際の臓器保存剤として有効に用いることができる。

10

20

30

フロントページの続き

審査官 関野 留香

(56)参考文献 国際公開第90/011080 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/7076

A61P 9/00

A61P 43/00

C07H 19/167

CA(STN)

REGISTRY(STN)